

**1/9/1**

DIALOG(R)File 347:JAPIO  
(c) 2000 JPO & JAPIO. All rts. reserv.  
05679800

**DETERMINATION OF ACTIVITY OF A PLURALITY OF PROMOTERS**

PUB. NO.: 09-294600 [JP 9294600 A]  
PUBLISHED: November 18, 1997 (19971118)  
INVENTOR(s): TATSUMI HIROKI  
FUKUDA MASARU  
KIKUCHI MAMORU  
KOYAMA TAIJI  
APPLICANT(s): KIKKOMAN CORP [000447] (A Japanese Company or Corporation),  
JP (Japan)  
APPL. NO.: 08-129294 [JP 96129294]  
FILED: April 26, 1996 (19960426)  
INTL CLASS: [6] C12Q-001/68; C12N-015/09; G01N-021/76  
JAPIO CLASS: 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry); 14.1  
(ORGANIC CHEMISTRY -- Organic Compounds); 46.2  
(INSTRUMENTATION -- Testing)

**ABSTRACT**

PROBLEM TO BE SOLVED: To simultaneously determine activities of a plurality of promoters in high sensitivity by allowing the cells (or their extract) including vectors having sequences of a plurality of luciferase genes emitting light of different colors connected to different promoters respectively to emit different lights.

SOLUTION: As 2 or more different kinds of luciferase genes emitting lights of different colors, are used mutant type firefly luciferase genes, which are bonded to different-promoters, respectively. Then, 2 or more kinds of these promoter luciferase fused genes are individually inserted into the vectors to prepare a recombinant DNA and the recombinant DNA is introduced into cells. The cells containing the recombinant DNA or an extract therefrom are brought into contact with luminous substrate solution containing luciferin from outside to emit light whereby the activities of a plurality of promoters can be simultaneously detected and determined in high sensitivity.

?

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-294600

(43)公開日 平成9年(1997)11月18日

(51)Int.Cl. <sup>*</sup>	機別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 Q 1/68		7823-4B	C 12 Q 1/68	Z
C 12 N 15/09			G 01 N 21/76	
G 01 N 21/76		9282-4B	C 12 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数2 FD (全5頁)

(21)出願番号 特願平8-129294	(71)出願人 キッコーマン株式会社 千葉県野田市野田339番地
(22)出願日 平成8年(1996)4月26日	(72)発明者 辰巳 宏樹 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン 株式会社内
	(72)発明者 福田 賢 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン 株式会社内
	(72)発明者 菊池 錠 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン 株式会社内
	最終頁に続く

(54)【発明の名称】複数のプロモーター活性の測定法

(57)【要約】

【解決手段】異なる色の光を発光する2種以上のルシフェラーゼ遺伝子に、異なるプロモーターを結合させ、これら2種以上のプロモーター・ルシフェラーゼ融合遺伝子を夫々ベクターに挿入した組み換え体DNAを含む細胞又は該細胞の抽出物を発光させる複数のプロモーター活性の測定法。

【効果】本発明によれば、複数のプロモーターの活性を同時に検出、定量等測定することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】異なる色の光を発光する2種以上のルシフェラーゼ遺伝子に、異なるプロモーターを結合させ、これら2種以上のプロモーター-ルシフェラーゼ融合遺伝子を夫々ベクターに挿入した組み換え体DNAを含む細胞又は該細胞の抽出物を発光させることを特徴とする複数のプロモーター活性の測定法。

【請求項2】請求項1記載のルシフェラーゼ遺伝子が異なる色の光を発光する変異型ホタルルシフェラーゼ遺伝子より選ばれたものである請求項1記載の複数のプロモーター活性の測定法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、複数のプロモーター活性の測定法に関する。

【従来の技術】従来、複数のプロモーター活性を、発色法、蛍光法等と比較し、感度において優れた発光法により、検出する方法は、確立されていなかった。

【発明が解決しようとする課題】本発明は、異なる色の光を発光する2種以上のルシフェラーゼ遺伝子に、異なるプロモーターを結合させ、これら2種以上のプロモーター-ルシフェラーゼ融合遺伝子を夫々ベクターに挿入した組み換え体DNAを含む細胞又は該細胞の抽出物を発光させる複数のプロモーター活性の測定法を提供することを目的とするものである。

## 【0002】

【課題を解決するための手段】そこで本発明者等は、上記課題を解決すべく種々検討を行なった結果、発光色が異なる2種以上のホタルルシフェラーゼ遺伝子に、夫々異なる大腸菌プロモーターを連結し、これら2種以上のプロモーター-ルシフェラーゼ融合遺伝子をベクターに挿入後、大腸菌に導入し、夫々のプロモーターの誘導条件で大腸菌を培養し、発光基質を添加すれば、夫々の誘導条件で発現すべきルシフェラーゼの活性が測定できること等の知見を得、本発明を完成了。すなわち本発明は、異なる色の光を発光する2種以上のルシフェラーゼ遺伝子に、異なるプロモーターを結合させ、これら2種以上のプロモーター-ルシフェラーゼ融合遺伝子を夫々ベクターに挿入した組み換え体DNAを含む細胞又は該細胞の抽出物を発光させることを特徴とする複数のプロモーター活性の測定法である。

【0003】以下、本発明を詳細に説明する。異なる色の光を発光するルシフェラーゼ遺伝子、例えば、ホタルルシフェラーゼ遺伝子は、自然界より異なる色の光を発光するホタルを採取し常法（例えば、Sambrook J. et al., Molecular Cloning, second edition, 18.60-18.75 (1989)）により単離することができる。また異なる色の光を発光するホタルルシフェラーゼ遺伝子は、野生型ホタルルシフェラーゼ遺伝子を特開平3-285683号公報記載の方法と同様にランダム変異することにより得ること

ができる。また、異なる色の光を発光するホタルルシフェラーゼ遺伝子は、特開平3-285683号公報に記載の発光色変異ゲンジボタルルシフェラーゼと同等の変異を他のホタルルシフェラーゼに部位特異的変異法（例えば、Kunkel, T. A. et al., Methods Enzymol., 154, 367-382 (1987)）により導入し、得ることができる。

【0004】異なる色の光を発光する2種以上のルシフェラーゼ遺伝子に、異なるプロモーター（例えば、大腸菌由来のラクトースプロモーター、入ファージ由来のP<sub>L</sub>プロモーター、カリフラワーモザイクウイルス由来のCaMV35Sプロモーター、サイトメガロウイルス由来のCMVプロモーター等）を連結し、これら2種以上のプロモーター-ルシフェラーゼ融合遺伝子を夫々異なるベクター

【例えば、pAG60 (Colbere-Garapin, F. et al., J. Mol. Biol., 150, 1 (1981))、pBIN19 (Bevan M., Nucleic Acids Res. 12, 8711)、pUC119 (宝酒造社・製) 等】に挿入した組み換え体DNAを、細胞（例えば、動物細胞（例えば、COS-7細胞、HeLa細胞、CHO細胞等）、植物細胞（例えば、ナス科植物細胞、セリ科植物細胞等）、微生物細胞（例えば、細菌、酵母、カビ等）等）に導入し、細胞を培養した後、細胞又は該細胞の抽出物に外部よりルシフェリンを含む発光基質溶液を接触、作用させて発光させ、発光をそのまま、または顕微鏡等を用いて観察する。必要によりカメラで撮影するか、あるいは発光スペクトルを分光測光システム、例えば、浜松フォトニクス社のPNA-100や大塚電子社のIMUC-7000等、及び波形解析ソフトにより分析することにより、複数のプロモーターの活性を検出、定量等測定することができる。本システムにより細胞、組織、オルガネラ等での複数のプロモーターの特異的発現を同時に検出することができ、また、複数のプロモーターの誘導物質を同時に検出することができる。

【0005】  
【発明の実施の形態】  
【実施例】以下、本発明を実施例を挙げて更に具体的に説明する。  
実施例

1. オレンジ色に発光するホタルルシフェラーゼをコードする遺伝子の取得

40 黄色に発光する、ヘイケボタル由来の耐熱性ルシフェラーゼ遺伝子に、ゲンジボタルルシフェラーゼの赤色変異C-H-3 (433番目のHis残基がTyr残基に置換されている。特開平3-285683号公報記載) と同等の変異を以下の方法により導入した。大腸菌CJ236 (pHLf107) [大腸菌CJ236はBIO-RAD社・製、pHLf107はpUC119 (宝酒造社・製) に217番目のAlaがLeuに置換されている耐熱性変異ヘイケボタルルシフェラーゼ (L1L-217L) 遺伝子が挿入されている (特開平7-289264号公報記載)] より、ヘルパーファージM13KO7 (宝酒造社・製) を用いて、1本鎖のプラスミドpHLf107を調製し、DNA Model 392 シンセサイダ

—(Applied Biosystems社・製)を用いて合成したオリゴヌクレオチドSLF85 (ATAAAGAAATATTTCTTCA) 及びMut-a-Gene in vitro Mutagenesis Kit (Bio-Rad社・製)を用いて、433番目のHis残基がTyr残基に置換された耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼ (LIL-217L/433Y) をコードする遺伝子を有する組み換え体プラスミドpHLf208DNAを得た(図1)。

【0006】組み換え体プラスミドpHLf208DNAを保有する大腸菌JM101 [pHLf208]を、滅菌済みのニトロセルロースフィルターに塗布し、50 μg/mlのアンビシリン及び1 mMイソプロピル-β-D-チオガラクトサイド (IPTG) を添加したLB寒天培地 [1% Bactotryptone (DIFCO社・製)、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム、1.4% 寒天]上で37°Cにて16時間培養した後、発光基質溶液 (0.5 mM ルシフェリン、100 μMクエン酸ナトリウム、pH 5.0) にニトロセルロースフィルターを浸し、暗所にて発光を観察した結果、大腸菌JM101 [pHLf208]は、オレンジ色に発光していることを確認した。すなわち赤色変異ゲンジボタルルシフェラーゼC-4-3と同等の変異をLIL-217Lに導入することにより、オレンジ色に発光するルシフェラーゼLIL-217L/433Yをコードする遺伝子が得られた。

【0007】2. アプラスミドColE1の複製起点を有し、trcプロモーター制御下でLIL-217L/433Y遺伝子を発現するアプラスミドpHL.f261の構築

組み換え体プラスミドpHLf208DNAを制限酵素EcoRIで切断し、LIL-217L/433Y遺伝子を含む断片をアガロースゲル電気泳動及びGENECLEAN 2 キット (BIOL01社・製)により回収し、EcoRIで切断したプラスミドpTrc99A (アプラスミドColE1の複製起点、大腸菌のトリプトファン合成酵素遺伝子のプロモーターであるtrpとラクトースプロモーターであるlacZより作成されたtrcプロモーター (IPTGにより誘導される) 及びtrcプロモーターのリプレッサーをコードするlacI<sup>c</sup>遺伝子を有する。Pharmacia Biotech社・製)と連結した。その結果、アプラスミドColE1の複製起点を有し、trcプロモーター制御下でオレンジ色に発光するルシフェラーゼLIL-217L/433Yをコードする遺伝子を発現し、マーカーとしてアンビシリン耐性遺伝子Apを有する組み換え体アプラスミドpHLf261DNAを構築した(図1)。

【0008】3. p15Aの複製起点を有し、P<sub>L</sub>プロモーター制御下でLIL-217L遺伝子を発現する組み換え体プラスミドpHLf265DNAの構築

アプラスミドpHLf107を制限酵素EcoRIで切断し、LIL-217L遺伝子を含む断片を項目2記載の方法で回収した。この断片の両端をDNA Blunting Kit (宝酒造社・製)を用いて平滑化し、制限酵素BpuIで切断しAlkaline Phosphatase (宝酒造社・製)により脱リン酸化したアプラスミドpPL-1aabda (入ファージ由来のP<sub>L</sub>プロモーター (ナリジキシン酸により誘導される) を有する)と連結し、P<sub>L</sub>プロモーター制御下で黄色に発光するルシフェラーゼLIL-21

7遺伝子を発現する組み換え体アプラスミドpHLf262DNAを作製した(図2)。組み換え体アプラスミドpHLf262DNAを制限酵素BamHIで切断し、P<sub>L</sub>プロモーター及びLIL-217L遺伝子を含む断片を項目2記載の方法で回収し、BamHIで切断したアプラスミドpACYC184 (アプラスミドp15A由来の複製起点を有し、アプラスミドColE1の複製起点を有するアプラスミドと同じ細胞中で共存可能である。ニッポンシンゲン社・製)と連結した。その結果、アプラスミドp15Aの複製起点を有し、P<sub>L</sub>プロモーター制御下で黄色に発光するルシフェラーゼLIL-217Lをコードする遺伝子を発現し、マーカーとしてクロラムフェニコール耐性遺伝子Caを有する組み換え体アプラスミドpHLf265DNAを構築した(図2)。

【0009】4. LIL-217L遺伝子及びLIL-217L/433Y遺伝子の誘導発現

組み換え体アプラスミドpHLf261DNA及び組み換え体アプラスミドpHLf265DNAを用いて、入ファージのリプレッサー遺伝子cIを有する大腸菌N99cI<sup>c</sup> (Pharmacia Biotech社・製)を形質転換し、Ap耐性及びCa耐性により両アプラスミドを有する大腸菌N99cI<sup>c</sup> [pHLf261/pHLf265] (工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-15602として寄託されている。)を選択した。大腸菌N99cI<sup>c</sup> [pHLf261/pHLf265]を10 μg/mlのクロラムフェニコール (Ca) 及び50 μg/mlのアンビシリン (Ap) を含む2 mlのLB培地にて30°C、120 rpmで一夜浸透培養した。この培養液20 μlを、10 μg/mlのCa、50 μg/mlのAp及びtrcプロモーターの活性を抑えるために1%のグルコースを添加したLB培地2 mlまたは10 μg/mlのCa、50 μg/mlのApを含む2 mlのLB培地に添加し、30°C、120 rpmにて4時間浸透培養した。前者に60 μg/mlのナリジキシン酸を、後者に0.2 mMのIPTGを添加し、30°C、120 rpmにて更に4時間浸透培養した。各々の培養液100 μlを遠心分離し、得られた菌体を50 μlの発光基質溶液 (0.5 mM ルシフェリン、100 μMクエン酸ナトリウム、pH 5.0) に懸濁し、フルオロNuncプレート (Nunc社・製)に移し、発光をエクタクロームプロフェッショナルP1600フィルム (KODAK社・製)を用いて撮影した(図3)。露出はF4.0で20分とした。図3に示した様に、ナリジキシン酸によりP<sub>L</sub>プロモーターの誘導を行ない、グルコースによりtrcプロモーターの抑制を行なった菌体は、黄色に発光が観察され、また、IPTGによりtrcプロモーターの誘導を行なった菌体は、オレンジ色の発光が観察された。すなわち発光色の異なるホタルルシフェラーゼの遺伝子を用いることにより2種類のプロモーター活性を発光法により検出することができる事が判明した。

【0010】

【発明の効果】本発明によれば、複数のプロモーターの活性を同時に検出、定量等測定することができ、本発明は、極めて有用である。

【図面の簡単な説明】

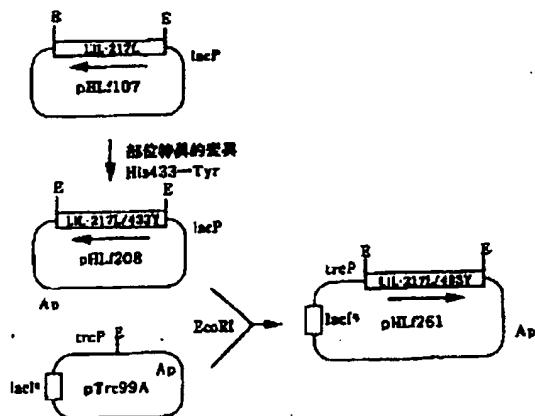
5

【図1】組み換え体プラスミドpHLf261DNAの構築図。  
 【図2】組み換え体プラスミドpHLf265DNAの構築図。  
 【図3】ナリジキシン酸またはIPTGで誘導した時の大腸

6

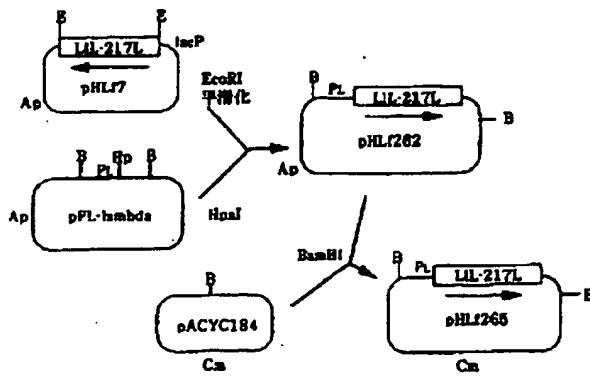
菌細胞の発光図をコンピューターにより白黒に変換した  
 図。

【図1】



Ap: アンビシリン耐性遺伝子; lacP: ラクトースプロモーター;  
 trcP: trcプロモーター; E: EcoRI; lacI<sup>r</sup>: ラクトースリプレッサー  
 遺伝子; B: EcoRI

【図2】



Ap: アンビシリン耐性遺伝子; Cm: クロラムフェニコール耐性遺伝子;  
 lacP: ラクトースプロモーター; P<sub>L</sub>: PLプロモーター; B: BamHI; E: EcoRI;  
 HpaI: HpaI

【図3】

ナリジキシン酸

IPTG

ナリジキシン酸またはIPTGで誘導した時の発光

## 【手続補正書】

【提出日】平成8年8月12日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】追加

【補正内容】

## 【図面の簡単な説明】

【図1】組み換え体プラスミドpHLf261DNAの構築図

【図2】組み換え体プラスミドpHLf265DNAの構築図

【図3】ナリジキシン酸またはIPTGで誘導した時の大腸  
菌菌体の発光図をコンピューターにより白黒に変換した  
中間調画像の図

---

フロントページの続き

(72)発明者 小山 泰二  
千葉県野田市野田339番地 キッコーマン  
株式会社内